

**UNIVERZITA KARLOVA**

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOCHEMIE

STUDIJNÍ OBOR BIOCHEMIE



Vliv inhibitorů tyrosinkinas na expresi biotransformačních enzymů

The inhibitors of tyrosine kinases and their effect on the expression of  
biotransformation enzymes

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Josef Dvořák

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Helena Dračínská, Ph.D.

Praha 2018

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně pod vedením RNDr. Heleny Dračínské, Ph.D., a že jsem řádně citoval všechny informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne:

Podpis: .....

Rád bych poděkoval své školitelce RNDr. Heleně Dračínské, Ph.D., která byla vzorem ochoty a profesionálního chování po dobu celé mé experimentální části a dalšího teoretického zpracování.

Dále děkuji celému týmu vyučujících chemického ústavu Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze za kvalitní přípravu pro můj budoucí profesní život.

V neposlední řadě chci poděkovat své rodině a přátelům za podporu během studia.

Uskutečnění experimentů v rámci této bakalářské práce podporoval grant (GAČR): „Komplexní pohled na mechanismus působení a metabolismus inhibitorů tyrosinkinas a studium přístupů k potenciaci jejich protinádorové účinnosti“ (GAČR:18-10251S)

## ABSTRAKT

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí u lidské populace. Jedním z mnoha možných důvodů vzniku nádorového bujení je abnormální funkce tyrosinkinas, které se podílejí na přenosu signálu a regulaci nejdůležitějších pochodů v buňce. Mezi tyto procesy patří kontrola buněčného růstu, dělení a buněčné diferenciaci a apoptosy. Pro terapii nádorových onemocnění způsobených abnormální funkcí tyrosinkinas se vyvíjí jejich specifické inhibitory. K cílené léčbě nádorů štítné žlázy se nově používají inhibitory tyrosinkinas vandetanib a lenvatinib.

V rámci této bakalářské práce byl zkoumán vliv vandetanibu a lenvatinibu na genovou expresi biotransformačních enzymů cytochromů P450 rodiny 2 (CYP2A2, CYP2B1, CYP2C11, CYP2D1, CYP2E1), protože se podílejí na biotransformačních reakcích velké části dostupných léčiv na trhu. Ke zkoumání relativní genové exprese CYP2 byla použita kvantitativní PCR vzorků cDNA syntetizovaných z izolované RNA z jater a ledvin potkanů vystavených výše zmíněným inhibitorům tyrosinkinas.

Výsledky naznačují, že vandetanib ani lenvatinib nemají v tkáni jater a ledvin potkanů prokazatelný výrazný vliv na genovou expresi zkoumaných zástupců cytochromů P450 rodiny 2.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** genová exprese, cytochromy P450, lenvatinib, vandetanib, inhibitory tyrosinkinas

## ABSTRACT

Tumor diseases are one of the most common causes of death in the human population. One of the many possible causes of tumor growth is abnormal function of tyrosine kinases, which are involved in signal transfer and regulation of the most important cell processes. These processes include the control of cell growth, division and cell differentiation and apoptosis. For the therapy of tumor diseases caused by the abnormal function of tyrosine kinases, their specific inhibitors are developed. For the targeted treatment of thyroid tumors, the tyrosine kinases vandetanib and lenvatinib are newly used.

In this bachelor thesis, the effect of vandetanib and lenvatinib on the gene expression of the cytochrome P450 family of 2 (CYP2A2, CYP2B1, CYP2C11, CYP2D1, CYP2E1) biotransformation enzymes has been investigated as they are involved in the biotransformation reactions of a large portion of the available drugs on the market. To examine the relative gene expression of CYP2, quantitative PCR of samples of cDNA, synthesized from isolated RNA from rat liver and kidney exposed to the above-mentioned tyrosine kinase inhibitors, was used.

The results suggest, that vandetanib and lenvatinib do not have a significant effect on the gene expression of cytochrome P450 family 2 in rat liver and kidney tissue.

**KEY WORDS:** gene expression, cytochromes P450, lenvatinib, vandetanib, tyrosine kinase inhibitors

(IN CZECH)

## OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	7
1 TEORETICKÝ ÚVOD .....	9
1.1. CYTOCHROMY P450 .....	10
1.1.1. ROZDĚLENÍ CYTOCHROMŮ P450 .....	12
1.1.2. INDUKCE CYTOCHROMŮ P450.....	13
1.1.3. CYTOCHROMY P450 RODINY 2 .....	15
1.2. TYROSINKINASY.....	19
1.3. INHIBITORY TYROSINKINAS .....	20
1.3.1. LENVATINIB.....	21
1.3.2. VANDETANIB.....	22
2 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE .....	23
3 MATERIÁL A METODY.....	24
3.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A POMŮCKY .....	24
3.2. POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	25
3.3. BIOLOGICKÝ MATERIÁL .....	26
3.4. IZOLACE RNA .....	26
3.5. HORIZONTÁLNÍ ELEKTROFORÉZA NA AGAROSOVÉM GELU .....	27
3.6. SPEKTROFOTOMETRICKÉ MĚŘENÍ KONCENTRACE A ČISTOTY RNA .....	28
3.7. REVERSNÍ TRANSKRIPCE .....	28
3.8. KVANTITATIVNÍ PCR .....	30
3.9. VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ KVANTITATIVNÍ PCR.....	31
4 VÝSLEDKY A DISKUSE .....	32
4.1. IZOLACE RNA.....	32
4.2. RELATIVNÍ GENOVÁ EXPRESE POTKANÍCH CYP2 .....	34
4.2.1. RELATIVNÍ GENOVÁ EXPRESE ZÁSTUPCŮ CYP2 V JATERNÍ TKÁNI .....	34
4.2.2. RELATIVNÍ GENOVÁ EXPRESE ZÁSTUPCŮ CYP2 V TKÁNI LEDVIN .....	36
5 ZÁVĚR .....	39
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	40

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

$A_{260}, A_{280}$	absorbance při vlnové délce 260 a 280 nm
Ah	receptor pro aromatické uhlovodíky
ATP	adenosintrifosfát
CAR	konstitutivní androstanový receptor
cDNA	komplementární DNA
CO	oxid uhelnatý
$C_{RNA}$	koncentrace RNA ve vzorku
CYP	cytochrom P450
DDT	1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan
dNTP	deoxyribonukleosidtrifosfát
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGF	epidermální růstový faktor
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
FGF	fibroblastový růstový faktor
FGFR	receptor pro fibroblastový růstový faktor
GR	receptor pro glukokortikoidy
K1-K4	vzorky získané z tkáně potkanů kontrolní skupiny
L1-L4	vzorky získané z tkáně potkanů, kteří byli vystaveni vlivu lenvatinibu
NTP	nukleosidtrifosfát
PCB	polychlorované bifenyly
PCR	polymerasová řetězová reakce
PDGF	růstový faktor z krevních destiček
PDGFR	receptor pro růstový faktor z krevních destiček
PPAR	receptor aktivovaný proliferátory peroxisomů
PXR	pregnanový X receptor
rRNA	ribosomální RNA

RET	receptor pro neurotrofní faktor
RXR	retinoidní X receptor
S <sub>D</sub>	směrodatná odchylka
TCDD	2, 3, 7, 8-tetrachloro-(p)-dioxin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
V1-V4	vzorky získané z tkáně potkanů, kteří byli vystaveni vlivu vandetanibu
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VEGFR	receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor



## 1 TEORETICKÝ ÚVOD

Nádorová onemocnění patří mezi civilizační choroby, proto je hledání jejich léčby věnován nespočet výzkumů. Při léčbě nádorových procesů se cílí na regulaci různých fyziologických procesů, které se podílejí na vzniku nádoru a jeho růstu<sup>1</sup>. Mezi fyziologické faktory podílející se na nádorových onemocněních patří buněčná proliferace bez přítomnosti externích růstových faktorů, nereagování na růstové supresory, odolávání buněčné smrti, angiogeneze, změna energetického metabolismu a vyhýbání se usmrcení buňkami imunitního systému<sup>2</sup>.

K výše zmíněným procesům dochází při abnormální funkci enzymů podílejících se na přenosu signálů regulujících základní pochody v buňce, mezi které patří regulace buněčného cyklu, diferenciace, metabolismu, transkripce, translace a replikace DNA<sup>3</sup>. Mezi širokou škálou enzymů podílejících se na přenosu signálů ovlivňujících výše zmíněné procesy patří tyrosinkiny<sup>3</sup>. Proto je ovlivnění funkce tyrosinkinas jednou z možných terapií při nádorových onemocněních<sup>4</sup>.

Vandetanib a lenvatinib patří mezi inhibitory tyrosinkinas. Využívají se při nádorových onemocněních štítné žlázy v případech, ve kterých není vhodná operace. Mají potenciální využití i při jiných nádorových onemocněních<sup>5-7</sup>.

Přítomnost některých látek v organismu může vyvolat zvýšení genové exprese enzymů, které se podílí na jejich vlastním metabolismu a tím urychlit jejich biotransformaci a následně detoxikaci. U léčiv je tento proces jedním z hlavních předmětů výzkumů, protože může mít vliv na jejich farmakokinetické vlastnosti<sup>8</sup>. Některá léčiva, tzv. proléčiva, získávají terapeutický účinek až po biotransformaci, naopak u některých léčiv dochází po biotransformaci k rychlejšímu vyloučení z organismu a tím ke zhoršení jejich farmakokinetických vlastností<sup>8</sup>. Dále je informace o vlivu léčiv na genovou expresi biotransformačních enzymů důležitá při podávání kombinace více léčiv najednou, například při chemoterapii. Změny v expresi biotransformačních enzymů vyvolané jedním léčivem mohou mít za následek zvýšenou tvorbu nežádoucích toxických produktů nebo naopak rychlejší detoxikaci druhého léčiva podávaného společně při terapii<sup>9</sup>.

Hlavní skupinou enzymů podílejících se na biotransformaci cizorodých látek jsou cytochromy P450 (cit.<sup>10</sup>). Studium vlivu léčiv na jejich genovou expresi je tedy velmi

užitečným poznáním, které přispívá porozumění mechanismu účinku daného léčiva či kombinace léčiv a může hrát klíčovou roli při dalším vývoji a optimalizaci terapie.

### 1.1. CYTOCHROMY P450

V roce 1958 bylo při spektrofotometrickém zkoumání vzorku mikrozomů z myších jater v prostředí CO pozorováno absorpční maximum při vlnové délce 450 nm. Toto maximum odpovídá cytochromům P450 v komplexu s CO. Název cytochromů P450 tedy vyplývá z faktu, že absorbují ve viditelné oblasti elektromagnetického spektra při vlnové délce 450 nm<sup>11</sup>. Převážně je lze nalézt v hladkém endoplasmatickém retikulu, některé jsou součástí membrány mitochondrií. V lidském těle se nejvíce vyskytují v jaterní tkáni, významné množství se nachází i v ledvinách, nadledvinkách, mozku, plicích a v tenkém střevě<sup>10</sup>.

Pod označením cytochromy P450 se skrývají desetitisíce enzymů, které je možné nalézt téměř ve všech živých organismech, ale také i v některých virech<sup>12</sup>. Jedná se o velice širokou škálu oxidoreduktas obsahujících hem jako prosthetickou skupinu, a proto se řadí mezi hemoproteiny<sup>13</sup>.

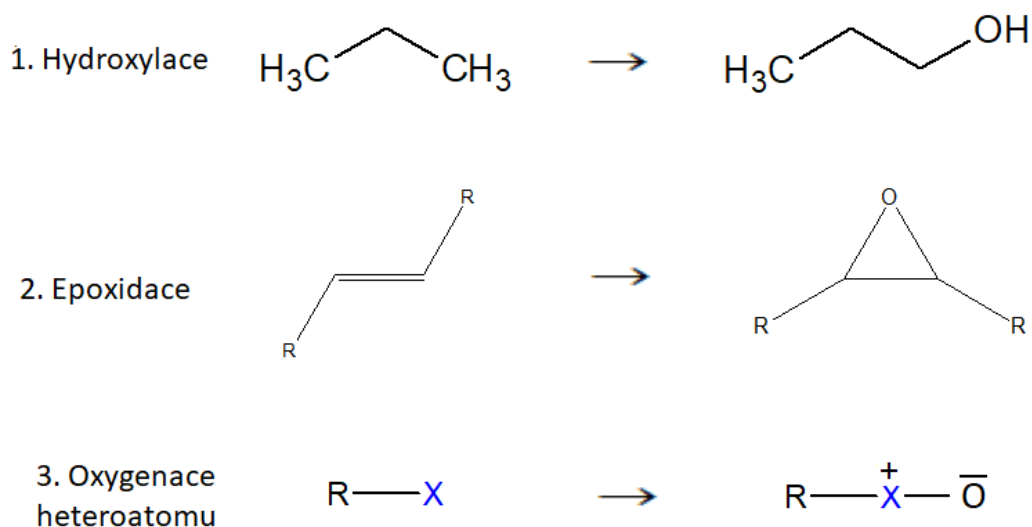
Navzdory pestrému množství struktur a substrátové specifity je sekvence vazného místa pro hem konzervována. Hem je tvořen porfyrinovým skeletem protoporfyrinu IX (cit.<sup>10</sup>). Porphyrinový skelet je vázaný v cytochromech P450 částečně hydrofobními silami a současně za pomoci thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu nacházejícího se v aktivním centru. Díky takovému uspořádání se cytochromy P450 mohou vyznačovat výjimečným spektrálním i katalytickým chováním v porovnání s ostatními hemoproteiny<sup>10</sup>.

Cytochromy P450 mají hlavní podíl na biotransformaci xenobiotik<sup>14,15</sup>. Jedná se o oxidoreduktasy katalyzující oxidaci substrátu, který se tak stává polárnější. Zvýšením polarity dochází ke snadnějšímu vyloučení xenobiotik z organismu a zabránění jejich bioakumulace. Bioakumulace je nežádoucí proces, při kterém dochází k nahromadění nepolárních xenobiotik v organismu, což může mít za následek různé zdravotní obtíže<sup>16</sup>. Při biotransformaci xenobiotik může dojít jednak k výše zmíněné deaktivaci, zvýšení polarity a vyloučení z organismu, ale může také dojít ke vzniku aktivnější sloučeniny, která může mít pozitivní dopad v případě některých léčiv a proléčiv, u kterých účinné látky získají svou biologickou aktivitu až po biotransformaci<sup>8</sup>. Aktivací xenobiotik však nemusí docházet pouze ke vzniku látky s kladným účinkem jako v případě léčiv a proléčiv, ale může dojít ke

vzniku aktivovaných xenobiotik s negativním vlivem na organismus. Takto aktivované xenobiotikum může způsobovat zdravotní problémy. V některých případech vede aktivace takových protoxikantů k velice závažným zdravotním potížím, které mohou končit úmrtím, např. při požití většího množství methanolu<sup>17</sup>. Aktivací skupiny xenobiotik, které se nazývají prokarcinogeny, může dojít ke vzniku sloučenin interagujících s DNA a způsobujících nádorová onemocnění<sup>18</sup>.

Cytochromy P450 jsou enzymy účastníci se oxidačních reakcí široké škály endogenních látek a xenobiotik. Tyto reakce lze rozdělit do čtyř hlavních kategorií: hydroxylační reakce, při kterých dochází k nahrazení atomu vodíku za hydroxylovou skupinu; epoxidační reakce, při kterých dochází k navázání atomu kyslíku na dvojici atomů uhlík – uhlík; oxidace heteroatomu, při které dochází k navázání kyslíku na heteroatomy organických sloučenin např. dusík nebo síru; redukční reakce, ke kterým dochází při nedostatku kyslíku za předpokladu, že je přítomen alternativní akceptor elektronů<sup>19</sup>. Výše zmíněné reakce jsou schematicky znázorněné na obrázku 1.

#### Schéma základních reakcí katalyzovaných cytochromy P450



*Obrázek 1* – Schématické vyobrazení tří typů nejčastějších reakcí katalyzovaných cytochromy P450. X – libovolný heteroatom (N,Cl,S,...); R – zbytek řetězce organické sloučeniny. Vytvořeno na základě<sup>20</sup>.

### 1.1.1. ROZDĚLENÍ CYTOCHROMŮ P450

Vzhledem ke genetické rozmanitosti tohoto souboru enzymů bylo nutné zavést systém jejich dělení. Cytochromy P450 se rozdělují do rodin a podrodin na základě shodnosti aminokyselinové sekvence, fylogenetické příbuznosti a uspořádání genu<sup>19</sup>. Příslušná rodina je označena arabskou číslicí a podrodina se označuje velkým tiskacím písmenem. Jednotlivé geny patřící do podrodiny se pak také označují arabskou číslicí a ta vychází z pořadí, ve kterém byly geny nahlášeny komisi pro názvosloví. Názvoslovný systém také počítá s pseudogeny. Pseudogeny jsou sekvence DNA, které neprodukují funkční proteiny, a označují se písmenem „P“ na konci názvu<sup>19</sup>.

Sekvence, které ukazují vyšší aminokyselinovou identitu než 40 % se zařazují do stejné rodiny. Pokud aminokyselinová sekvence vykazuje shodnost vyšší než 55 % je zařazena do stejné podrodiny<sup>19</sup>.

Cytochromy P450 patří mezi základní enzymy živých organismů. Vzhledem k tomuto faktu je očíslování rodin ještě rozděleno mezi různé třídy živých organismů. CYP1 – CYP49 a CYP301 – CYP499 jsou enzymy živočišné, CYP51 – CYP69 a CYP501 – CYP699 jsou enzymy nižších eukaryot, CYP71 – CYP99 a CYP701 – CYP 999 jsou rostlinné enzymy a CYP101 – CYP299 jsou bakteriální enzymy<sup>19</sup>.

Po určité době zkoumání cytochromů P450 jich bylo objeveno tak velké množství, že rozdělení do rodin není dostatečné. Proto byl vytvořen systém klanů. Klan CYP je fylogenetické uskupení rodin, které mají společné vlastnosti a při tom se odlišují od svých evolučních předchůdců a ostatních rodin<sup>21</sup>.

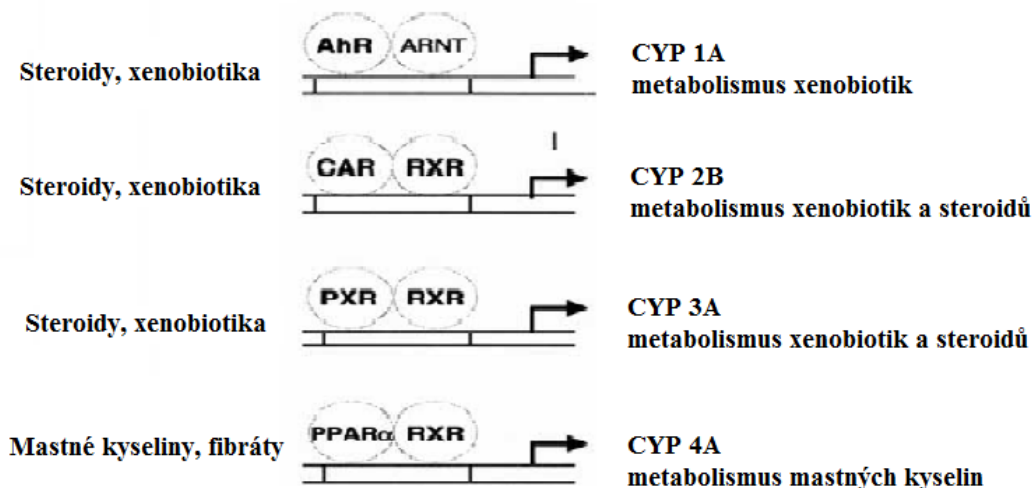
### 1.1.2. INDUKCE CYTOCHROMŮ P450

Enzymovou indukci poprvé detailně popsali koncem 50. a začátkem 60. let 20. století F. Jacob a J. Monod<sup>22</sup>. Ve své studii definovali teorii bakteriálního *lac* operonu, při které dochází ke zvýšené genové expresi (indukci) bakteriálního enzymu laktasy. K indukci došlo po přidání laktosy samotné, popřípadě strukturně příbuzné molekuly. Pokud induktory již nebyly přítomny, tak se enzym nadále nesyntetizoval<sup>22</sup>. V případě většiny cytochromů P450 je indukce možná v přítomnosti různých látek, např. polychlorovanými bifenylly (PCB)<sup>23</sup>. Induktorů cytochromů P450 je široká škála, z nichž některé induktory mohou být zároveň jejich substráty při biotransformaci, např. protinádorové léčivo taxol<sup>23</sup>. U léčiv je požadavek na schopnost indukce cytochromů P450 různý. U některých léčiv je to nežádoucí vlastnost, která urychluje jejich metabolismus, zvyšuje detoxikaci léčiv a tím zhoršuje jejich terapeutický účinek, protože účinná látka se rychleji vyloučí z těla. Na druhé straně existují proléčiva, která jsou aktivována příslušnými indukovanými biotransformačními enzymy. Aktivace proléčiv způsobí vznik biologicky aktivní sloučeniny a tím tedy pozitivně ovlivňuje jejich účinek na organismus<sup>8</sup>. V neposlední řadě může zvýšeným množstvím biotransformačních enzymů dojít ke vzniku bioaktivního intermediátu, který může přispívat k hepatotoxicitě<sup>24</sup>. V případě chemoterapie je využita kombinace protinádorových léčiv, u kterých je třeba znát jejich vzájemný vliv a tím docílit maximální možné efektivity léčby a eliminaci vzniku možných nežádoucích látek v organismu pacienta<sup>9</sup>.

Cytochromy P450 mají vliv na metabolismus, účinnost nebo toxicitu léčiv a xenobiotik. Mohou se také podílet na aktivaci prokarcinogenů. Vzhledem k těmto důvodům je mechanismus indukce cytochromů P450 předmětem mnoha výzkumů. Mezi prvními zkoumanými byla indukce cytochromu P450 1A1 polycyklickými aromatickými uhlovodíky, mezi které patří také známé karcinogeny 3-methylcholanthrene, benzo[a]pyren a 2,3,7,8-tetrachloro-(p)-dioxin (TCDD)<sup>23</sup>. Při této studii se ukázala vysoká afinita polycyklických aromatických uhlovodíků vůči Ah receptoru (Aromatic Hydrocarbon receptor – receptor pro aromatické uhlovodíky) v cytosolu. Byly zkoumány dva kmeny myší, z nichž jeden byl náchylný k indukci polycyklickými aromatickými uhlovodíky a druhý nikoli. Ukázalo se, že hlavní rozdíl mezi těmito dvěma kmeny byla rozdílná genetická informace kódující právě výše zmíněný receptor Ah<sup>23</sup>. Tímto výzkumem se prokázalo, že jedním z mechanismů indukce je zvýšená genová exprese. Zvýšená genová exprese není jediným mechanismem

indukce enzymů. Další možností je indukce pomocí stabilizace mRNA kódující indukovaný enzym a také stabilizace indukovaného enzymu. Typickým příkladem tohoto mechanismu je indukce cytochromu P450 2E1<sup>25</sup>. Na indukci cytochromů P450 se podílí mimo Ah receptoru ještě další skupina receptorů. Jedná se o jaderné receptory CAR (Constitutive Androstane Receptor – konstitutivní androstanový receptor), PXR (Pregnane X Receptor – pregnanový X receptor), RXR (Retinoid X Receptor – retinoidní X receptor), PPARα (Peroxisome Proliferator – Activated Receptor α – receptor α aktivovaný proliferátory peroxisomů), které se podílejí na indukci cytochromů P450 rodin 1 – 4<sup>23</sup>. Schématické vyobrazení kooperace těchto receptorů včetně rodin cytochromů P450, které ovlivňují, a stručná informace účelu indukce je znázorněno na obrázku 2. Za zmínku stojí GR (Glucocorticoid Receptor – receptor pro glukokortikoidy), který se nepřímo účastní indukce podněcováním zvýšené genové exprese PXR a CAR<sup>26,27</sup>. GR interaguje např. s dexamethasonem nebo hydrokortisonem<sup>23</sup>. Rodina jaderných receptorů ovlivňujících genovou expresi má několik společných znaků, mezi které patří variabilní N-konec, vysoce konzervovaná doména pro vázání DNA, místo ukotvující receptor v membráně a doména vázající ligand<sup>28</sup>.

#### Transkripční faktory cytochromů P450



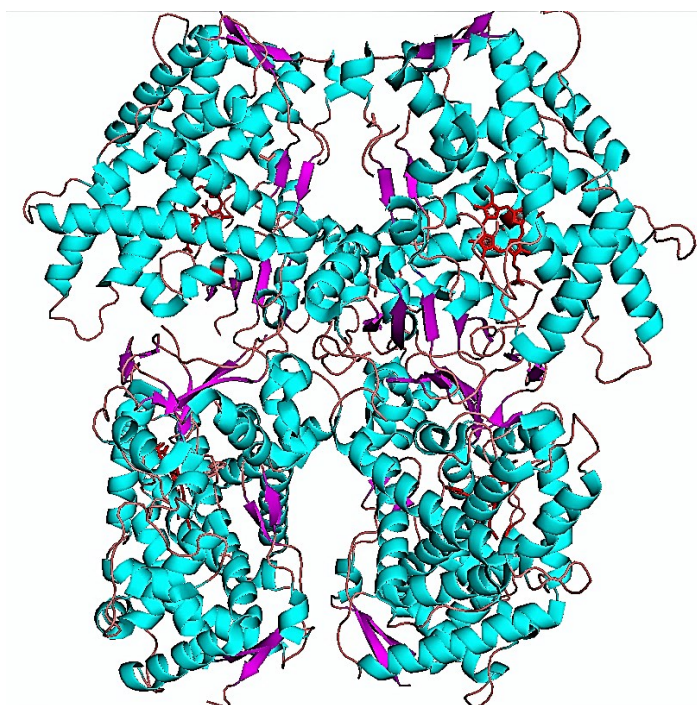
*Obrázek 2* – Zjednodušené schéma naznačující vztah mezi jednotlivými transkripčními faktory iniciovanými induktory a výsledně exprimovanými rodinami cytochromů P450. CYP – cytochrom P450. Podrobnější vysvětlení v textu (1.1.2. INDUKCE CYTOCHROMŮ P450). Upraveno dle<sup>23</sup>.

### 1.1.3. CYTOCHROMY P450 RODINY 2

Cytochromy P450 jsou velice rozmanitou skupinou a liší se mezi jednotlivými organismy. Zkoumány byly odlišnosti hlavně mezi lidskými, opičími a potkaními izoformami cytochromů P450 jednotlivých podrodin. Tyto informace jsou užitečné v medicíně při potenciální aplikaci výsledků studií prováděných na pokusných zvířatech<sup>29</sup>. Jednotlivé izoformy se liší substrátovou specifitou, mírou genové exprese, procentuálním zastoupením oproti celkovému množství všech cytochromů P450 v živočišném druhu a v neposlední řadě orgánovou specifitou. Výjimkou je cytochrom P450 2E1, který je vysoce konzervovaný, lidský je z 80 % shodný s potkaním a z 96 % shodný s opičím<sup>29</sup>.

U člověka je rodina 2 nepočatnější skupinou ze všech cytochromů P450, její zástupci tvoří přibližně třetinu celkového množství cytochromů P450. Klasifikuje se do třinácti podrodin, které se skládají ze šestnácti funkčních genů a třinácti potvrzených pseudogenů<sup>19</sup>.

Zástupci rodiny 2 mají důležitou roli v metabolismu léčiv. Některé izoformy jsou exprimovány v závislosti na pohlaví, z čehož plyne, že se podílejí především na hydroxylaci steroidů včetně pohlavně specifických steroidů<sup>19</sup>. Jeden z hlavních zástupců rodiny 2 CYP2A6 je vyobrazen na obrázku 3.



*Obrázek 3* – Vyobrazení prostorové struktury cytochromu P450 2A6. Světle modrou barvou jsou znázorněny  $\alpha$  – helixy, fialově  $\beta$  – listy, tělovou barvou nepravidelné části aminokyselinového řetězce a červeně jsou znázorněny hemy (Upraveno v PyMol® dle PDB - 2FDV).

Mechanismus indukce cytochromů P450 rodiny 2 je obdobný mechanismu indukce u celé superrodiny CYP. Zahrnuje cytosolové i jaderné receptory, které ovlivňují genovou expresi, i faktory zvyšující stabilitu kódující mRNA a cytochromů samotných. Hlavní roli pro rodinu 2 hraje CAR, PXR, RXR, a nepřímo také GR<sup>23</sup>. CAR v jaterních buňkách interaguje s proteinem umocňujícím vliv fenobarbitalu. Tento komplex má klíčový význam při indukci genů cytochromů P450 2B<sup>30</sup>. Je důležité podotknout, že ne všechny známé induktory pro potkaní CAR mají efekt na lidský CAR, což je jedna z ukázek problematiky přenesení dat z experimentů na jiných organismech na lidské cytochromy P450<sup>23</sup>. Na základě vyzkoumaných informací lze tvrdit, že na zvýšené genové expresi v rámci jednoho enzymu se podílí více receptorů<sup>23</sup>.

#### 1.1.3.1. CYTOCHROM P450 PODRODINY 2A

Mezi lidské cytochromy P450 2A patří CYP2A6, 2A7 a 2A13. Jsou exprimovány v jaterních buňkách, ve kterých CYP2A6 tvoří přibližně 4 % z celkového počtu exprimovaných cytochromů P450 a ostatní zástupci 2A ještě méně<sup>29</sup>.

Zatímco u hlodavců se CYP2A podílejí na hydroxylaci steroidů, tak lidský CYP2A6 tuto aktivitu nemá<sup>29</sup>. Zde je dobře zřejmý rozdíl mezi cytochromy P450 stejné podrodiny napříč různými živočišnými druhy. CYP2A6 se katalytickou specifikou překrývá s CYP2E1 při aktivaci nitrosaminů<sup>31</sup>.

U potkanů zahrnuje podrodina 2A CYP2A1, 2A2, 2A3. CYP2A1 je dominantní u samic a CYP2A2 je dominantní u samců. Oba jsou exprimovány v játrech<sup>32</sup> na rozdíl od CYP2A3, který se vyskytuje např. v plicích. CYP2A1/2 jsou aminokyselinovou sekvencí přibližně z 60 % shodné s lidskou izoformou CYP2A6, ale jak již bylo zmíněno výše, liší se specifikou pro substráty<sup>29</sup>.

Izoformy CYP2A jsou u lidí indukovatelné např. rifampicinem nebo nikotinem<sup>29</sup>. Mechanismus indukce CYP2A není moc dobře prozkoumán, ale existují studie, které se tímto tématem zabývaly a částečně popsaly mechanismu indukce myšího CYP2A5 zahrnující vliv CAR, PXR a PPAR<sup>33</sup>.



#### 1.1.3.2. CYTOCHROM P450 PODRODINY 2B

Mezi lidské CYP2B patří CYP2B6 a 2B7. Jsou exprimovány v játrech (CYP2B6) a v plicích (CYP2B7). CYP2B6 se podílí na metabolismu velkého množství léčiv a některých prokarcinogenů např. aflatoxinu B1. Bylo zjištěno, že CYP2B6 tvoří 2-10 % z celkového množství CYP v játrech<sup>29</sup>.

Potkaní cytochromy P4502B jsou CYP2B1, 2B2, 2B3. CYP 2B1 a 2B2 jsou si podobné z 97 % a mají i obdobnou substrátovou specifitu, přičemž CYP2B1 má větší katalytickou aktivitu. Jsou exprimovány v játrech<sup>29</sup>.

Tato podrodina může být velice výrazně indukována jak u člověka, tak i u potkanů. Důkazem je indukce fenobarbitalem u různých živočišných druhů, která se realizuje využitím CAR receptoru<sup>34,35</sup>.

#### 1.1.3.3. CYTOCHROM P450 PODRODINY 2C

U lidí se podílí CYP2C na metabolismu přibližně 16 % léčiv<sup>29</sup>. Do lidských cytochromů P450 podrodiny 2C patří CYP2C8 a 2C9, které patří mezi nejvíce exprimované izoformy podrodiny CYP2C. Naopak CYP2C18 a CYP2C19 jsou nejméně exprimované izoformy. Především je lze nalézt v játrech, kromě CYP 2C18, kde tvoří přibližně 20 % celkového počtu cytochromů P450. CYP 2C8 se účastní metabolismu např. retinolu, CYP 2C9 metabolizuje mnoho důležitých léčiv, tuto funkci má i CYP2C19, i když ne tak rozsáhlou<sup>29</sup>.

Izoformy patřící mezi potkaní cytochromy P450 podrodiny 2C jsou CYP2C6, 2C7, 2C11, 2C12, 2C13, 2C22 a 2C23. Jedná se o nejrozmanitější podrodinu vyskytující se v potkaních játrech. Podílí se na oxidaci dihydropyridinu, aflatoxinu B1 a na hydroxylaci steroidů. Tvoří až 50 % celkového množství cytochromů P450<sup>29</sup>. CYP2C11 patří mezi výhradně samčí izoformu, která je vysoce indukována u dospívajících samců potkana (4. – 5. týden věku) a katalyzuje 2 $\alpha$ - a 16 $\alpha$ -hydroxylaci androgenů v játrech dospělých samčích jedinců<sup>36</sup>.

Lidské izoformy CYP2C8, 2C9 a 2C19 jsou indukovatelné sloučeninami, které aktivují PXR a CAR<sup>29</sup>.

#### 1.1.3.4. CYTOCHROMY P450 PODRODINY 2D

Cytochromy P450 podrodiny 2D byli identifikováni především u savců. Účastní se monooxygenace různých chemických sloučenin včetně různorodé skupiny léčiv. Do skupiny léčiv, které podrodina CYP2D biotransformuje patří např. antidepresiva,  $\beta$ -blokátory nebo antiarytmika<sup>37</sup>. Podrodina 2D byla první podrodinou, u které byl sledován polymorfismus<sup>29</sup>.

Lidský CYP2D6 se podílí na biotransformaci přibližně 30 % na trhu dostupných léčiv a to i přes to, že je exprimován v játrech v množství odpovídajícímu asi 4 % z celkového množství cytochromů P450<sup>38</sup>. Je exprimován např. v játrech, ledvinách, placentě, mozku a plicích. Orthologem CYP2D6 je CYP2D1. CYP2D7 a 2D8 jsou inaktivní pseudogeny<sup>29</sup>.

Potkaní CYP2D obsahuje 6 izoform CYP2D1, 2D2, 2D3, 2D4, 2D5, 2D18. Ukázalo se, že lidské a potkaní CYP2D mají vysokou (> 70 %) podobnost aminokyselinové sekvence<sup>39</sup>. Podobně jako lidský CYP2D6 jsou exprimovány v různých tkáních. Výzkumy ukázaly, že CYP2D2 a CYP2D3 se vyskytují především v tkáni jater, ledvin a sliznice tenkého střeva. CYP2D1 a CYP2D5 se vyskytují mimo tkáň jater, ledvin a sliznice tenkého střeva i v tkáni mozku, nadledvin, vaječníků a varlat<sup>37</sup>. Substrátová specifita jednotlivých izoform se obdobně jako orgánová specifita liší u jednotlivých izoform. Například 5 izoform CYP2D se při metabolismu mianserinu podílejí na jeho 8-hydroxlační reakci, ale pouze CYP2D1 katalyzuje v některých případech N-oxidaci<sup>40</sup>.

O indukci cytochromů P450 podrodiny 2D se zatím ví jen málo. Byl proveden výzkum studující vliv mikroRNA na genovou expresi *CYP2D6*, ve kterém byla indukce vyvolána přítomností dexamethasonu<sup>41</sup>.

#### 1.1.3.5. CYTOCHROM P450 PODRINY 2E1

CYP2E1 je jedinou izoformou v podrodině 2E. Je vysoce konzervovaný napříč živočišnými druhy. Lidský CYP2E1 je z 80 % shodný s potkaním CYP2E1 a z 96 % s opičím CYP2E1. Tvorbí přibližně 6 % z celkového množství cytochromů P450 v játrech a je zapojen do metabolismu přibližně 2 % léčiv na trhu<sup>38</sup>. Ukazuje se, že má dva typy fyziologických účinků, účastní se nejen detoxikace xenobiotik, ale za určitých okolností napomáhá i při metabolismu živin<sup>29</sup>. K indukci CYP2E1, který se podílí na detoxikaci ethanolu, dochází při zvýšené hladině ethanolu v organismu, což zabraňuje dosažení nebezpečné koncentrace ethanolu v organismu<sup>29</sup>. V případě v metabolismu živin má indukce CYP2E1 užitečnou roli

při hladovění, kdy přispívá k metabolismu mastných kyselin a má schopnost přeměňovat ketony na glukosu<sup>42</sup>.

K indukci CYP2E1 dochází z ochranných důvodů při vystavení xenobiotikům nejen perorálně a při poranění, ale i vdechnutím, proto se CYP2E1 exprimuje především v nosní sliznici, plicích, a játrech<sup>29</sup>. Mechanismus indukce CYP2E1 je komplexní a zahrnuje i stabilizaci mRNA a CYP2E1 samotného<sup>25</sup>.

Na druhou stranu CYP2E1 nemá pouze pozitivní roli v metabolismu. Jeho zvýšená produkce může hrát roli při aktivacích některých karcinogenů a vést ke zvýšené tvorbě volných radikálů a tím podporovat oxidativní stres.<sup>29</sup>

## 1.2.TYROSINKINASY

Jedná se o skupinu enzymů patřící do třídy proteinkinasy. Proteinkinasy obecně katalyzují přenos fosfátové skupiny na aminokyselinové zbytky tyrosinu, serinu a threoninu<sup>43</sup>. Přenos  $\gamma$  – fosfátové skupiny z nukleosidtrifosfátu (NTP) na hydroxylovou skupinu serinu, threoninu a tyrosinu je zprostředkován proteinkinasovým aminokyselinovým zbytkem kyseliny asparagové. Tento mechanismus je společný pro všechny proteinkinasy, to znamená, že rozdílná funkce a substrátová specifita zástupců jednotlivých rodin a podrodin je dána variabilitou funkčního a regulačního místa dané proteinkinasy. Tyrosinkinasy katalyzují reakce, ve kterých se přenáší fosfátová skupina z ATP na hydroxylovou skupinu aminokyselinového zbytku tyrosinu<sup>43</sup>.

Tyrosinkinasy lze rozdělit do dvou hlavních rodin: receptorové a nereceptorové. Receptorové tyrosinkinasy jsou receptory na povrchu buňky s vysokou afinitou pro mnoho polypeptidových růstových faktorů, cytokinů a hormonů. Z 90 unikátních genů pro tyrosinkinasy známých v lidské DNA kóduje receptorové tyrosinkinasy 58 genů<sup>44</sup>. Nereceptorové tyrosinkinasy se nacházejí v cytosolu a jsou klíčové např. při přenosu signálů skrze B- a T- buněčné receptory<sup>45</sup>.

Působením různých vnějších buněčných stimulátorů (hormony, cytokiny, ikosanoidy a růstové faktory) je vyvolána fosforylační kaskáda zahrnující proteinkinasy/tyrosinkinasy, které fungují jako zprostředkovatelé přenosu signálu pomocí reversibilní fosforylace proteinů v buňce. Tento zprostředkovaný přenos signálu má výsledný vliv na transkripci a

translaci určitého genu/genů tak, aby došlo k požadované buněčné odpovědi. Proteinkinasy jsou zásadní pro širokou škálu buněčných procesů: metabolismus, stres, transkripce, translace, replikace DNA a regulace buněčného cyklu<sup>3</sup>. U mnohobuněčných eukaryot se navíc účastní vývoje orgánů, nervových signálů, apoptosy a komunikace mezi buňkami<sup>3,46</sup>.

Tyrosinkinasy, které jsou cílem terapie protinádorovými léčivými, se podílejí na regulaci buněčného cyklu a apoptosy. Mezi cílové tyrosinkinasy patří VEGFR, FGFR, PDGFR, EGFR, ERK. EGFR (Epidermal Growth Factor receptor – receptor pro epidermální růstový faktor) je receptorem pro EGF (Epidermal Growth Factor – epidermální růstový faktor) v jehož signální dráze je tyrosinkinasa ERK, která se podílí na přenosu signálu jako součást fosforylační kaskády, a podílí se na buněčné diferenciaci a buněčném růstu<sup>4</sup>. VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor) je receptorem pro VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor – vaskulární endoteliální růstový faktor) podílející se na vaskulogenezi a angiogenezi. PDGFR (Platelet – Derived Growth Factor Receptor – receptor pro růstový faktor z krevních destiček) reaguje na přítomnost PDGF (Platelet – Derived Growth Factor růstový faktor z krevních destiček) a podílí se diferenciací buňky, proliferací a vývoji buňky. FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor překladem receptor pro fibroblastový růstový faktor) je receptorem pro FGF (Fibroblast Growth Factor v překladu fibroblastový růstový faktor) a podílí se na podpoře tvorby fibroblastů<sup>4</sup>.

### 1.3. INHIBITORY TYROSINKINAS

Abnormální funkce tyrosinkinas způsobená jejich mutací může vést buď ke zvýšení nebo snížení jejich fosforylační aktivity. To má za následek změnu v průběhu přenosu signálu a může ve výsledku způsobovat některé poruchy nebo dokonce mít podíl na maligních procesech<sup>47,48</sup>.

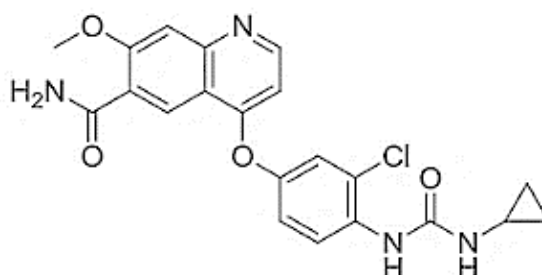
Na tyrosinkinasy, jejichž abnormální funkce může vést k nádorovým procesům, se cílí při terapii nádorových onemocnění. Využívají se specifické inhibitory určitých tyrosinkinas zapojených v signálních procesech, které mají za následek nádorová onemocnění<sup>49</sup>.

Inhibitory tyrosinkinas jsou třídou protinádorových léčiv specificky zacílených na tyrosinkinasy. V některých případech jsou inhibitory tyrosinkinas účinné při zpomalování

růstu nebo eliminaci nádorových buněk, protože tyrosinkinasy, jak již bylo zmíněno výše, jsou důležitými faktory ovlivňujícími osud buňky (proliferace a přežití)<sup>50</sup>.

### 1.3.1. LENVATINIB

Lenvatinib (Obr.4) prodáván pod obchodním názvem Lenvima®, je perorální léčivo využívané při léčbě nádorových onemocnění štítné žlázy, ale zkoumá se jeho uplatnění i při jiných typech nádorových onemocnění. Funguje jako inhibitor tyrosinkinas VEGFR1-3, FGFR1-4, PDGFR $\alpha$  a receptoru pro neurotrofnní faktor (RET)<sup>5,7</sup>.

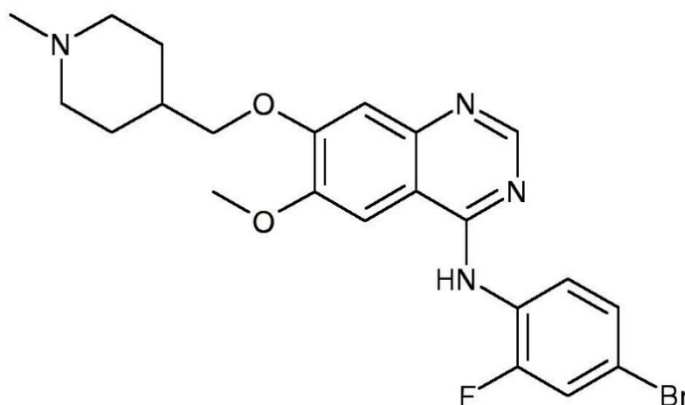


Obrázek 4 – Strukturní vzorec protinádorového léčiva Lenvatinib. Převzato<sup>51</sup>.

Metabolismus lenvatinibu je předmětem studií posledních let. Při fázích preklinického testování byly objeveny unikátní metabolické dráhy u potkanů a opic. U člověka byly ve fekáliích prokázány lenvatinibu příbuzné látky současně s malým množstvím nezměněné původní sloučeniny. Hlavní reakce, kterými je lenvatinib biotransformován je hydrolýza, oxidace, hydroxylace, N-oxidace, dealkylace a konjugace s kyselinou glukuronovou. Byly pozorovány různé kombinace těchto reakcí s následnými modifikacemi zahrnujícími hydrolýzu, konjugaci s cysteinem/glutathionem, intramolekulární přeuspořádání a dimerizace. Některé metabolity se zdají unikátní napříč zkoumanými živočišnými druhy (potkan, opice a člověk). Vzhledem k nízké koncentraci metabolitů lenvatinibu v krevní plazmě v porovnání s nezměněnou molekulou lze předpokládat, že biologický účinek má právě nepozměněná molekula samotného lenvatinibu<sup>52</sup>. Dle prozatímních studií se na oxidačních reakcích lenvatinibu podílí cytochromy P450, přepokládá se CYP3A4<sup>53</sup> a enzym aldehydoxidasa<sup>51</sup>.

### 1.3.2. VANDETANIB

Vandetanib (Obr. 5) je obdobně jako lenvatinib perorální protinádorové léčivo fungující na principu inhibice tyrosinkinas. Využívá se především při nádorových onemocněních štítné žlázy, ale je možné ho využít i při jiných maligních procesech např. při rakovině prsu nebo plic<sup>54</sup>. Vandetanib inhibuje tyrosinkinasy RET, EGFR, VEGF, VEGFR<sup>6</sup>.



Obrázek 5 - Strukturní vzorec protinádorového léčiva vandetanib. Převzato<sup>55</sup>.

Jelikož je vandetanib relativně nové léčivo jsou jeho metabolické dráhy stále předmětem výzkumů. V provedených studiích bylo pozorováno vyloučení nezměněného vandetanibu a jeho dvou metabolitů N – desmethylvandetanibu a vandetanib-N-oxidu močí a exkrementy. Byla potvrzena konjugace metabolitů s kyselinou glukuronovou<sup>56</sup>. Na metabolismu vandetanibu se podílejí obdobně jako u lenvatinibu i cytochromy P450, přesněji CYP3A4<sup>57</sup>.

## 2 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo studium vlivu protinádorových léčiv vandetanibu a lenvatinibu na genovou expresi zástupců cytochromů P450 rodiny 2 v potkaních játrech a ledvinách *in vivo*. Pozorován byl vliv studovaných inhibitorů tyrosinkinas na genovou expresi CYP 2A2, 2B1, 2C11, 2D1, 2E1. Tyto informace mohou částečně doplnit kompletní představu o vlivu na biotransformační enzymy, které se mohou účastnit metabolické přeměny léčiva podaného v kombinaci s výše zmíněnými inhibitory a tím ovlivnit požadovaný efekt použité léčby.

Hlavními cíli této bakalářské práce bylo:

- Izolovat RNA z tkáně ledvin a jater potkanů vystavených vlivu vandetanibu nebo lenvatinibu a potkanů kontrolních.
- Syntetizovat komplementární DNA (cDNA) reversní transkripcí vzorků izolované RNA.
- Za použití kvantitativní PCR porovnat relativní genovou expresi 5 izoform cytochromů P450 rodiny 2 v játrech a ledvinách potkanů vystavených vlivu vandetanibu nebo lenvatinibu a potkanů kontrolních.

### 3 MATERIÁL A METODY

#### 3.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A POMŮCKY

##### Izolace RNA

<b>Linde, ČR:</b>	kapalný dusík
<b>Ambion, USA:</b>	voda bez přítomnosti RNas („RNas free“)
<b>Lach: Ner, ČR:</b>	isopropanol ethanol
<b>Penta, ČR:</b>	chloroform H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> EDTA
<b>Geneaid, Taiwan:</b>	GENEzol™ Reagent

##### Agarosová elektroforéza

<b>Invitrogen, UK:</b>	agarosa
<b>Sigma-Aldrich, USA:</b>	TRIS
<b>Merci, ČR:</b>	kyselina boritá
<b>Ambion, USA:</b>	„RNase“ free voda
<b>Thermo Fischer Scientific, USA:</b>	DNA Gel Loading dye (6x) Barva Sybr™ Green II
<b>BioLabs® inc NEW ENGLAND, USA:</b>	RNA marker ssRNA Ladder Pufr pro marker RNA Loading Dye (2x)

##### Reversní transkripce

<b>Applied Biosystems, USA;</b>	High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit: <ul style="list-style-type: none"><li>- „RNase free“ H<sub>2</sub>O</li><li>- 25x dNTP Mix (směs deoxyribonukleosidtrifosfátů)</li><li>- 10x RT „buffer“ (reakční pufr)</li><li>- „RNase inhibitor“ (inhibitor RNas)</li><li>- 10x RT „Random Primers“ (směs náhodných hexamerů)</li><li>- MultiScribe™ reversní transkriptasa (50 U/μl)</li></ul>
<b>Thermo Fischer Scientific, USA;</b>	DNase I: <ul style="list-style-type: none"><li>- 50 mM EDTA</li><li>- 10x reaction buffer with MgCl<sub>2</sub> (reakční pufr s MgCl<sub>2</sub>)</li><li>- DNase I, „RNase free“</li></ul>



### Kvantitativní PCR

**Roche, Švýcarsko;**

•FastStart Essential DNA Probes Master 2x koncentrovaný:

- FastStart Taq DNA Polymerase (polymeráza)
- reakční pufr
- dNTP mix (dUTP místo dTTP) (deoxyribonukleotidy)
- MgCl<sub>2</sub>

•FastStart Essential DNA Probes Master H<sub>2</sub>O PCR kvalita

**Thermo Fischer Scientific, USA:** Primers and probe assay TaqMan Gene Expression assay ( $\beta$  – aktin, *CYP2B1*, *2C11*)

**IDT, USA:**

PrimeTime® Std. qPCR Assay (*CYP2A2*, *2D1*, *2E1*)

## 3.2. POUŽITÉ PŘÍSTROJE

### Izolace RNA

**Labox ČR:**

„Flow-box“

**Eppendorf, Německo:**

Automatické pipety

**Labnet, USA:**

Mikrocentrifuga C1301

**IKA®, Německo:**

Třepačka VORTEX GENIUS 3

**Eppendorf, Německo:**

Centrifuga 5415 R

**MIULAB, Čína:**

„Thermoblok“ Mini Dry Bath MINIB – 100

### Horizontální elektroforéza na agarosovém gelu

**MIULAB, Čína:**

„Thermoblok“ Mini Dry Bath MINIB – 100

**Cleaver Scientific, UK:**

Sestava na elektroforézu MultiSub Mini

**Amersham Pharmacia Biotech, USA:** Zdroj stejnosměrného napětí Electrophoresis Power Supply – EPS 301

**Labnet, USA:**

Mikrocentrifuga C1301

**Eppendorf, Německo:**

Automatické pipety

**Clare Chemical Reaserch, USA:**

Vizualizační prosvěcovač Dark Reader®

**Maestro GEN, Taiwan:**

Nástavec pro fotoaparát

**Canon:**

Fotoaparát G16

### Měření čistoty a koncentrace RNA

**DeNovix®, USA:**

Spekrofotometr DS-11+ Spectrofotometer

**Eppendorf, Německo:**

Automatické pipety

### Kvantitativní PCR

**CORBETT RESEARCH, UK:**

„Thermocycler“ Rotor-Gene 2000 Real-Time Cycler

**Eppendorf, Německo:**

Automatická opakovací pipeta

### 3.3. BIOLOGICKÝ MATERIÁL

Zkoumána byla tkáň jater a ledvin ze 3 skupin potkanů. V každé skupině byli 4 samci laboratorního potkana kmene Wistar. Každému jedinci byla podána sondou do žaludku (gaváží) dávka příslušného inhibitoru tyrosinkinas v rozpouštědle 1% Tween 80. Potkani byli po 24 hodinách po podání dávky usmrceni. Dávkování a označení skupin a vzorků jsou uvedeny v následující tabulce 1.

*Tabulka 1 - Popis dávek a označení jednotlivých skupin vzorků.*

SKUPINA	DÁVKA (v 1% Tween 80)	OZNAČENÍ SKUPINY	OZNAČENÍ VZORKŮ
Kontrola	Pouze 1% Tween 80	K	K1 - K4
Vandetanib	vandetanib 30 mg/kg potkana	V	V1 - V4
Lenvatinib	lenvatinib 30 mg/kg potkana	L	L1 - L4

Manipulace s potkany byla prováděna v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání (č. 409/2008 Sb.) a vyhláškou O chovu a využití pokusných zvířat (č. 419/2012 Sb.). Podání látek a manipulace se zvířaty nebyly součástí této bakalářské práce.

### 3.4. IZOLACE RNA

Při izolaci RNA bylo postupováno dle návodu přiloženého k GENEzol™ Reagent<sup>58</sup>. Veškerá práce s otevřenými vzorky byla prováděna ve sterilním prostředí, které bylo zajištěné přístrojem „flow-box“.

Tkáň ze 4 potkanů patřících do jedné skupiny byla při homogenizaci spojena a poté rozdělena na 4 jednotlivé vzorky určené k izolaci RNA. Vzorek 50 – 100 mg tkáně složený ze stejně velkých kousků ze 4 jedinců byl homogenizován tloučkem v třecí misce při stálém chlazení kapalným dusíkem, aby tkáň nerozmrzla.

Po homogenizaci na jemný prášek byla tkáň převedena do 1,5 ml centrifugační plastové zkumavky bez obsahu RNas („RNase free“) s 1 ml GENEzol™ Reagent a následovalo třepání na třepačce. Takto zamíchaný vzorek byl ponechán stát po dobu 5 min. V případě izolace RNA z jater byl přidán mezikrok centrifugace 14 000 × g po dobu 10 min při 4 °C, po které byl odebrán supernatant.

Ke vzorku bylo přidáno 200  $\mu$ l chloroformu. Následovalo třepání pomocí třepačky po dobu 15 s a inkubace po dobu 3 min při laboratorní teplotě. Takto připravený vzorek byl centrifugován 15 min při  $14\,000 \times g$  při 4 °C. Po centrifugaci byla odebrána vrchní vodná fáze obsahující RNA do nové plastové 1,5 ml „RNase free“ centrifugační zkumavky.

Do odebrané vodné fáze byl přidán objem isopropanolu tak, aby poměr vodná fáze: isopropanol byl 1 : 1. Vzorek byl jemně promíchán převrácením a byl ponechán inkubovat po dobu 10 min při pokojové teplotě. Následovala centrifugace 10 min při  $14\,000 \times g$  při 4 °C, aby se vytvořila peleta RNA.

Supernatant byl vylit a k peletě byl přidán 1 ml 70% ethanolu. Peleta se 70% ethanolem byla lehce promíchána na třepačce. Následovala centrifugace 5 min při  $14\,000 \times g$  při 4 °C. Supernatant byl opatrně odpipetován tak, aby nedošlo ke kontaktu s peletou. Peleta byla vysušena v „thermobloku“ při 55 °C.

Peleta RNA byla resuspendována v případě vzorku z jater v 60  $\mu$ l a v případě vzorku z ledvin v 40  $\mu$ l „RNase free“ vody. Vzniklý roztok byl rozaliquotován, zamražen a uchován při -80 °C.

### 3.5. HORIZONTÁLNÍ ELEKTROFORÉZA NA AGAROSOVÉM GELU

Pro potvrzení úspěšné izolace RNA byla využita metoda agarosové elektroforézy vzorků izolované RNA, u které se postupovalo dle běžných laboratorních postupů.

V Erlenmayerově baňce byl připraven 1% roztok agarosy rozpuštěním 0,4 g agarosy v 40 ml 0,5 $\times$  koncentrovaném pufru TBE (5 $\times$  koncentrovaný TBE pufr: 445 mM TRIS, 445 mM kyselina boritá, 10 mM EDTA, pH 8 – 8,3). Roztok byl zahřát v mikrovlnné troubě do rozpuštění agarosy a nalit do připravené vaničky utěsněné z obou stran gumovým těsněním. Z nalitého gelu se sterilní pipetovací špičkou odstranily všechny vzniklé bublinky a byly vloženy 2 hřebeny. Takto připravený gel se nechal ztuhnout přibližně 30 min.

Vzorky pro elektroforézu byly připraveny následovně. Do 0,2 ml plastových „RNase free“ zkumavek byly pipetovány 3  $\mu$ l MilliQ H<sub>2</sub>O, 1  $\mu$ l vzorkového pufru 6x Loading Dye a 2  $\mu$ l roztoku izolované RNA.

Marker ssRNA Ladder byl připraven dle návodu výrobce<sup>59</sup>. Do 0,2ml sterilní plastové mikrozkušavky bylo napipetováno 2  $\mu$ l markeru ssRNA Ladder a 8  $\mu$ l pufru RNA Loading Dye (2 $\times$ ). Následně proběhla inkubace při 90 °C po dobu 2 min.

Ztuhlý agarosový gel byl vložen do plastové nádoby na elektroforézu a zalit 270 ml pufru 0,5 $\times$  TBE.

Do jamek gelu ponořeného do pufru byl pipetován celý objem vzorku RNA (6  $\mu$ l) a markeru (10  $\mu$ l). Elektroforéza byla prováděna při napětí 110 V po dobu 30 – 40 min. Doba provádění elektroforézy se lišila u různých sérií vzorků. Důležité bylo, aby čelo elektroforézy dosáhlo do cca. 80 % celkové možné dráhy na gelu.

Po proběhnutí elektroforézy byl gel ponořen do 50 ml 10 000 $\times$  ředěného roztoku barvy Sybr Green II. Ponořený gel byl ponechán třepat po dobu 30 min.

Vizualizace obarveného gelu proběhla na přístroji Dark Reader. Gel byl vyfocen na fotoaparát Canon G 16 s využitím nástavce MAESTROGEN.

### 3.6. SPEKTROFOTOMETRICKÉ MĚŘENÍ KONCENTRACE A ČISTOTY RNA

Pro další krok, kterým je reversní transkripce, byla třeba zjistit koncentrace izolované RNA. K tomu byl využit program pro ssRNA spektrofotometru DeNovix® DS-11+ Spectrofotometr využívající pro výpočet obecně platnou skutečnost, že RNA o absorbanci  $A_{260} = 1$  má koncentraci  $c_{RNA} = 40 \mu\text{g/ml}$ . V programu ssRNA byl zjištěn také poměr  $A_{260}/A_{280}$  ukazující míru čistoty RNA.

Na měřicí místo pro mikroobjemy vzorků přístroje DeNovix® DS-11+ Spectrofotometr bylo pipetováno 1,5  $\mu$ l vzorku a byla změřena absorbance při vlnové délce 260 a 280 nm.

### 3.7. REVERSNÍ TRANSKRIPCE

Reversní transkripce je krokem, který následuje po izolaci RNA a předchází kvantitativní PCR. Pro reversní transkripci byla použit sada High Capacity cDNA Transcription Kit od Applied Biosystems™. Postup reversní transkripce tedy vychází z návodu výrobce<sup>60</sup>.

Celý proces reversní transkripce, kdy bylo nakládáno s otevřenými vzorky mRNA, probíhal ve sterilním prostředí, které bylo zajišťováno přístrojem „flow-box“.

Byl připraven MIX složený pro 1 vzorek z 4,2  $\mu$ l „RNase free“  $H_2O$ , 2  $\mu$ l 10x RT pufr, 2  $\mu$ l 10x RT Random Primers, 0,8  $\mu$ l 25x dNTP MIX (100mM) a 1  $\mu$ l inhibitoru RNas a 1  $\mu$ g RNA.

Do 0,2ml sterilní plastové mikrozkuhavky byl pipetován objem vzorku obsahující 1  $\mu$ g RNA a byl doplněn na výsledných 10  $\mu$ l vodou bez obsahu RNas.

Do takto připravených 10  $\mu$ l roztoku, který obsahoval 1  $\mu$ g mRNA, bylo přidáno 10  $\mu$ l roztoku MIX. Z této směsi byly do 0,2ml sterilních plastových mikrozkuhovek odebrány 2  $\mu$ l jako negativní kontrola, do které se v dalším kroku nepřidávala reversní transkriptasa.

V dalším kroku byl do vzorku, ne do 2  $\mu$ l negativních kontrol, přidán 1  $\mu$ l reversní transkriptasy MultiScribe™ od Applied Biosystems™. Vzorek byl přemístěn do „thermocycleru“ TECHNE Techgene.

„Thermocycler“ byl nastaven na program: 25 °C po dobu 10 min, poté 37 °C na 120 min a nakonec 85 °C po dobu 5 min s následným chlazením při 4 °C pro uchování vzorků. Vzorky byly následně uchovány při -80 °C a dále využity při kvantitativní PCR.

V případě vzorků RNA izolovaných z ledvin se postup reversní transkripce lišil použitím enzymu DNase I Thermo Fischer Scientific. Postup reversní transkripce za použití komerční sady High Capacity cDNA Transcription Kit Applied Biosystems™ a enzymu DNase I byl tedy kombinací návodů obou výrobců<sup>60,61</sup>.

K 1  $\mu$ g RNA (objem vypočten v závislosti na koncentraci vzorku) byl přidán 1  $\mu$ l inhibitoru RNas, 1  $\mu$ l 10x reaction buffer with  $MgCl_2$  a 1  $\mu$ l DNase I (50 U/  $\mu$ l). Reakční směs byla doplněna vodou na celkový objem 10  $\mu$ l. Reakční směs byla inkubována při 37 °C po dobu 30 min. Následně byl přidán 1  $\mu$ l 50 mM EDTA a následovala inkubace při 65 °C po dobu 10 min.

Následující postup byl analogický postupu u vzorků RNA izolovaných z jater. Do reakční směsi po použití DNase I (11  $\mu$ l) bylo přidáno 9  $\mu$ l „preMixu“ obsahujícího 4,2  $\mu$ l „RNase free“  $H_2O$ , 2  $\mu$ l 10x RT buffer, 2  $\mu$ l RT random primers a 0,8 25x 100mM dNTP Mix na 1 vzorek.

Následný postup nakládání se vzorky RNA izolované z tkáně ledvin byl shodný s postupem u vzorků RNA izolovaných z jater.

### 3.8. KVANTITATIVNÍ PCR

Kvantitativní PCR slouží ke zjištění míry relativní genové exprese ze vzorků cDNA. K provedení kvantitativní PCR byl použit komerční roztok FastStart Essentials DNA Probes Master od společnosti Roche. Postupováno bylo tedy dle návodu výrobce<sup>62</sup>. Vzorky cDNA spolu s negativními kontrolami po reversní transkripci byly 10× naředěny vodou ve kvalitě pro PCR.

Dalším krokem byla příprava „premixu“, který se pro 1 vzorek skládal z 10 µl Roche FastStart Essential DNA Probes Master 2x koncentrovaný, 4 µl H<sub>2</sub>O ve kvalitě pro PCR a 1 µl komerčně dostupné směsi obsahující „primery“ a fluorescenčně značenou komplementární sondu příslušnou pro požadovaný gen. Takto připravený „premix“ byl pipetován pomocí automatické opakovací pipety Eppendorf po 15 µl do PCR mikrozkušavek v chladícím stojánu. Dále bylo přidáno 5 µl 10x ředěné cDNA nebo 10x ředěných negativních kontrol. Výsledný objem reakční směsi byl tedy 20 µl.

Připravené PCR mikrozkušavky byly vloženy do „thermocycleru“ Rotor – Gene 2000. Podmínky kvantitativní PCR (Tabulka 2) byly nastaveny pomocí programu Rotor – Gene 5.

*Tabulka 2* - Popis podmínek kvantitativní PCR. Krok 1 proběhl pouze na počátku. Následoval krok 2, který se opakoval 50x.

KROK	NASTAVENÍ	PODMÍNKY	POČET CYKLŮ
1	1.1.	95 °C ; 10 min	1
2	2.1.	95 °C ; 15 s	50
	2.2.	60 °C ; 60 s	

### 3.9. VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ KVANTITATIVNÍ PCR

Mimo cílové geny zkoumání (*CYP2A2*, *2B1*, *2C11*, *2D1*, *2E1*) byla provedena kvantitativní PCR i pro *β-aktin*, který má konstantní genovou expresi, a je tedy vhodnou referenční hodnotou. Pro každý vzorek byla provedena 2 paralelní měření, ze kterých byla vypočtena aritmetickým průměrem hodnota čísla cyklu  $C_T$ . Hodnota  $C_T$  vyjadřuje číslo cyklu, při kterém fluorescence začne stoupat nad měřitelnou prahovou hodnotu. U všech vzorků by měla být odečtena při stejném nastavení fluorescenčního signálu. Odečtením hodnoty  $C_T$  *β-aktinu* od hodnoty  $C_T$  cílového genu se získala hodnota  $\Delta C_T$  dle vzorce (1).

$$\Delta C_T = C_{T_{\text{cílový gen}}} - C_{T_{\beta\text{-aktin}}} \quad 1$$

Odečtením hodnoty  $\Delta C_T$  kontrolní skupiny od hodnoty  $\Delta C_T$  premedikované skupiny získáme hodnotu  $\Delta\Delta C_T$  dle vzorce (2).

$$\Delta\Delta C_{T_{\text{premedikované skupiny}}} = \Delta C_{T_{\text{premedikované skupiny}}} - \Delta C_{T_{\text{kontrolní skupiny}}} \quad 2$$

Míra indukce cílového genu (*I*) v potkanech vystavených vlivu zkoumaných inhibitorů tyrosinkinas v porovnání s kontrolní skupinou byla určena dle vzorce (3).

$$I = 2^{-\Delta\Delta C_{T_{\text{premedikované skupiny}}}} \quad 3$$

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

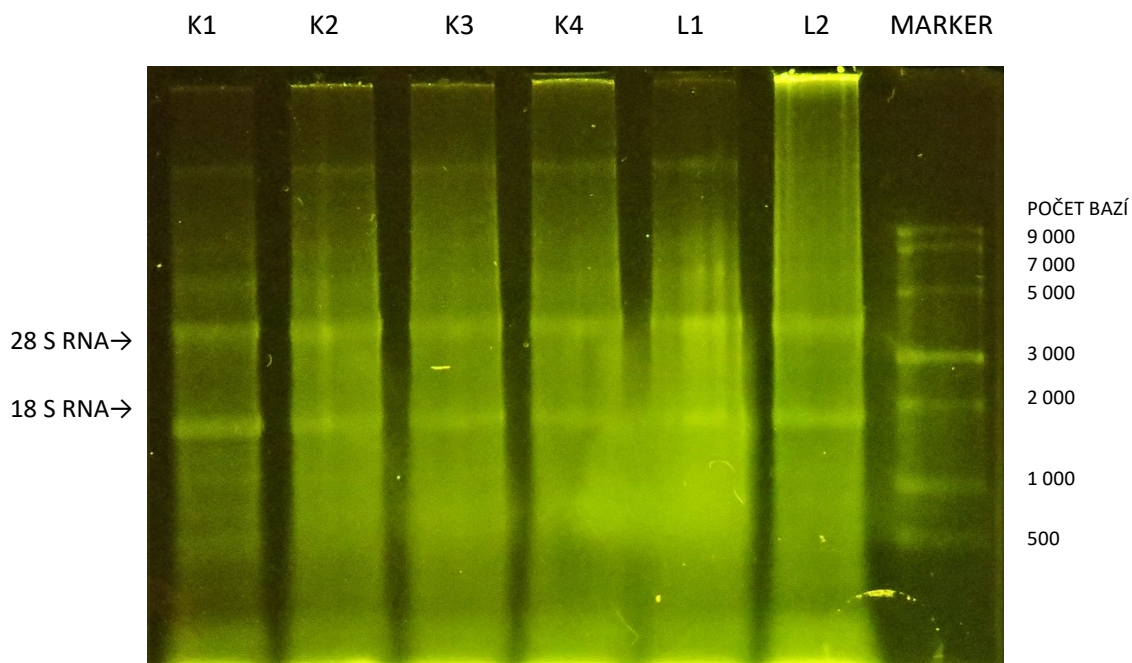
Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, zda inhibitory tyrosinkinas vandetanib a lenvatinib ovlivňují genovou expresi enzymů cytochromů P450 rodiny 2, které se podílejí na biotransformačních reakcích v organismech<sup>10</sup>. Konkrétně byl zkoumán vliv na genovou expresi cytochromů P450 2A2, 2B1, 2C11, 2D1, 2E1 v potkaních játrech a ledvinách. Vandetanib a lenvatinib jsou účinné látky léčiv proti nádorovým onemocněním. Vyšší účinnosti terapie při nádorových onemocněních je dosaženo podáváním kombinace různých léčiv<sup>9</sup>. Případný vliv jednoho léčiva na biotransformační enzymy může mít za následek vznik nežádoucích metabolitů anebo rychlejší detoxikaci druhého léčiva podávaného souběžně s ním a tím ovlivňovat účinnost léčby v případě vystavení pacienta kombinaci různých léčiv.

### 4.1. IZOLACE RNA

Pro zkoumání míry genové exprese je klíčovým krokem izolace RNA, která je v buňce vytvářena transkripcí z DNA. Míra transkripce genu z DNA do RNA je ovlivnitelný proces. Na proces transkripce genu do mRNA mají kromě jiných faktorů vliv látky, kterým je organismus exponován. (1.1.2. INDUKCE CYTOCHROMŮ P450).

Pro potvrzení kvality získané RNA izolované z tkáně potkanů byla provedena agarosová elektroforéza jednotlivých vzorků spolu s markerem obsahujícím RNA. Byla potvrzena přítomnost nedegradované RNA ve vzorcích, neboť se na gelu po obarvení a prosvícení UV světlem objevily 2 proužky odpovídající 18S ribosomální RNA (rRNA) a 28S rRNA. Ukázka gelu vzorků po agarosové elektroforéze se nachází na obrázku 6 (str.33). Izolace RNA tedy proběhla úspěšně.





Obrázek 6 – Ukázka gelu obarveného barvou Sybr Green II po provedení horizontální agarosové elektroforézy. Vzorky izolované z tkáně jater kontrolní skupiny jsou označeny K1 – K4 a vzorky izolované z jaterní tkáně potkanů vystavených vlivu vandetanibu jsou označeny V1 a V2.

K ověření míry úspěšnosti izolace a znečištění sloužilo měření koncentrace a čistoty RNA ve vzorcích (Tabulka 3). Zjištění koncentrace bylo zásadní pro další nakládání se vzorky. Hodnoty koncentrací RNA ve vzorcích byly použity pro výpočet potřebného objemu pipetovaného do reakční směsi při reversní transkripci.

Tabulka 3 – Výsledky stanovení koncentrace a čistoty vzorků RNA izolovaných z jaterní a ledvinné tkáně potkanů kontrolní skupiny (K1- K4) a potkanů vystavených vlivu vandetanibu (V1-V4) nebo lenvatinibu (L1-L4).

VZOREK	vzorky z jater		vzorky z ledviny	
	$c / \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	$A_{260}/A_{280}$	$c / \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	$A_{260}/A_{280}$
K1	0,9	2,1	2,8	2,1
K2	2,3	2,0	2,5	2,0
K3	2,2	2,0	2,2	2,1
K4	2,5	2,0	1,7	2,0
V1	2,4	2,0	1,5	2,0
V2	2,4	2,0	2,0	2,0
V3	1,7	2,1	1,1	2,0
V4	2,0	2,0	1,5	2,0
L1	2,5	2,1	2,6	2,0
L2	2,0	2,0	2,0	2,0
L3	1,5	2,1	2,3	2,1
L4	1,6	2,0	1,1	2,0

Hodnota poměru  $A_{260}/A_{280}$  by se měla u neznečištěné RNA pohybovat okolo hodnot 1,9 -2. Z hodnot odečtených při měření čistoty vzorků získaných při izolaci RNA z tkáně potkanů lze usoudit, že se jedná o vzorky obsahující výrazně neznečištěné a nedegradované molekuly RNA.

#### 4.2.RELATIVNÍ GENOVÁ EXPRESE POTKANÍCH CYP2

Kvantitativní PCR následuje po reversní transkripci vzorků izolované RNA ze zkoumané tkáně potkanů do cDNA. Kvantitativní PCR – polymerasová řetězová reakce, slouží ke sledování amplifikace určitého genu ve vzorku v reálném čase. Vzorky z potkanů, kterým byla podána dávka vandetanibu nebo lenvatinibu byly porovnány s kontrolní skupinou, která nebyla vystavena vlivu inhibitorů tyrosinkinas.

Výjimkou v procesu zjišťování míry genové exprese byl krok opakované reversní transkripce u vzorků z tkáně ledvin. Při kvantitativní PCR došlo k nárůstu fluorescenčního signálu i u negativních kontrol, ve kterých nebyla obsažena reversní transkriptasa a nemohlo v nich tedy dojít k syntéze cDNA během reversní transkripce. To naznačilo chybu buď v procesu reversní transkripce nebo možné znečištění vzorků izolované RNA genomovou DNA. Reversní transkripce byla tedy zopakována s použitím nukleasy DNasa I od Thermo Fischer Scientific. Po opakované reversní transkripci znovu nedošlo k nárůstu fluorescenčního signálu negativních kontrol z reversní transkripce současně se vzorky obsahujícími cDNA.

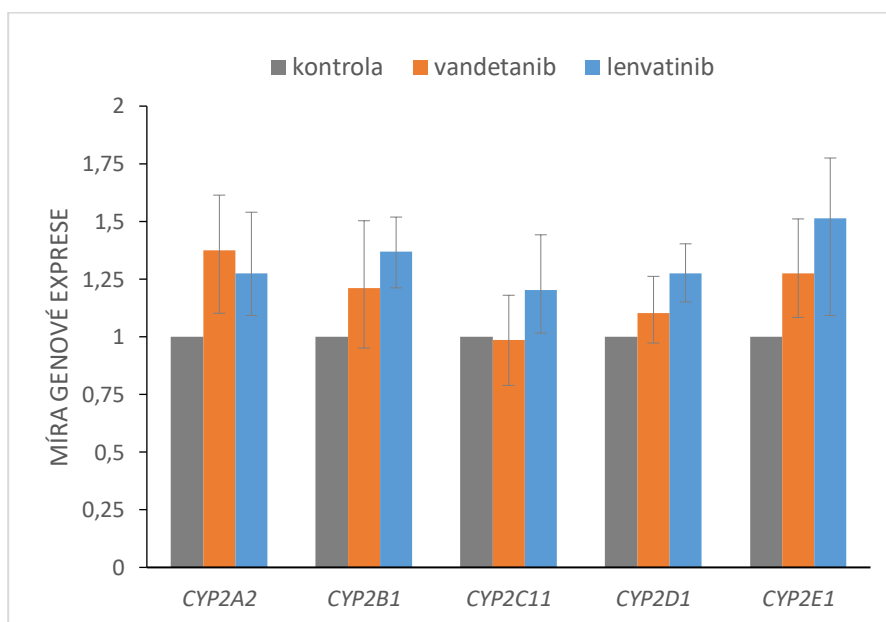
##### 4.2.1. RELATIVNÍ GENOVÁ EXPRESE ZÁSTUPCŮ CYP2 V JATERNÍ TKÁNI

Naměřené hodnoty relativního zastoupení jednotlivých CYP2 v jaterní tkáni potkanů vystavených vlivu vandetanibu nebo lenvatinibu a potkanů skupiny kontrolní jsou shrnuty spolu s příslušnými směrodatnými odchylkami v tabulce 4 (str. 35).

Tabulka 4 – Relativní kvantifikace genové exprese jaterních cytochromů P450 rodiny 2 vyjádřená pomocí hodnoty  $\Delta\Delta C_t$  (3.9. VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ KVANTITATIVNÍ PCR) a příslušné směrodatné odchylky. Kontrolní skupina (K), skupina potkanů vystavených vlivu vandetanibu (V) a lenvatinibu (L).

SKUPINA	K		V		L	
GEN	$\Delta\Delta C_t$	$S_D$	$\Delta\Delta C_t$	$S_D$	$\Delta\Delta C_t$	$S_D$
<i>CYP 2A2</i>	-1,06	0,25	-1,52	0,20	-1,41	0,09
<i>CYP 2B1</i>	0,33	0,19	0,06	0,31	-0,12	0,13
<i>CYP 2C11</i>	-2,26	0,26	-2,24	0,23	-2,52	0,14
<i>CYP 2D1</i>	0,48	0,17	0,33	0,15	0,13	0,1
<i>CYP 2E1</i>	2,38	0,21	2,03	0,26	1,78	0,10

Relativní genová exprese zkoumaných genů v jaterní tkáni potkanů vystavených vlivu vandetanibu a lenvatinibu v porovnání s mírou genové exprese zkoumaných genů u potkanů kontrolní skupiny je vyjádřena na obrázku 7.



Obrázek 7 – Relativní genová exprese cytochromů P450 rodiny 2 v jaterní tkáni potkanů po podání vandetanibu nebo lenvatinibu. Standardní chyba měření byla vyhodnocena programem REST 2009.

Na základě výsledků lze usuzovat, že vandetanib ani lenvatinib nemají výrazný vliv na míru genové exprese CYP2 v jaterní tkáni potkanů.

Po podání lenvatinibu došlo v jaterní tkáni potkanů k mírnému zvýšení relativní genové exprese *CYP2B1* a *CYP2E1*. V případě vzorků získaných z jaterní tkáně potkanů vystavených vandetanibu byla nalezena mírně zvýšená hodnota relativní genové exprese v případě *CYP2A2*.

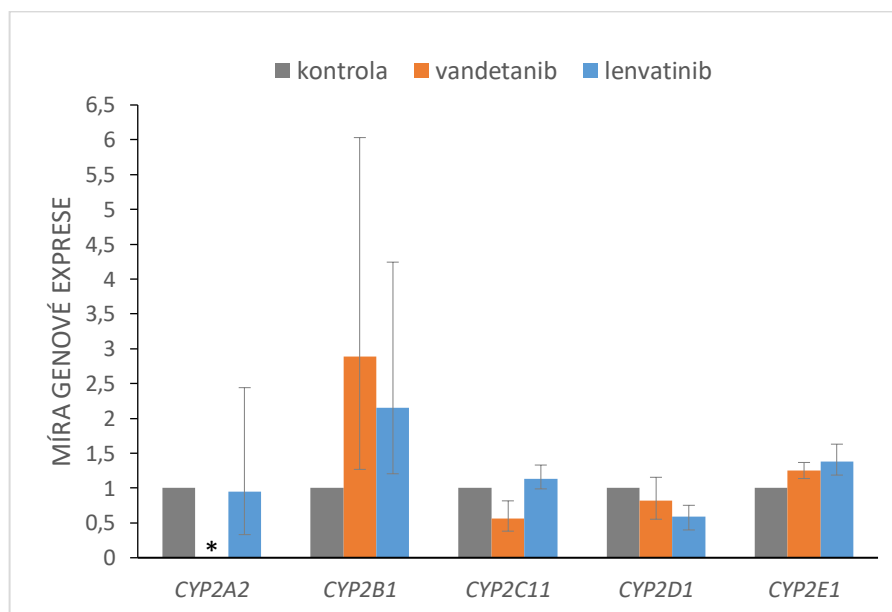
#### 4.2.2. RELATIVNÍ GENOVÁ EXPRESE ZÁSTUPCŮ CYP2 V TKÁNI LEDVIN

Relativní zastoupení cytochromů P450 rodiny 2 v ledvinné tkáni potkanů vystavených vlivu vandetanibu nebo lenvatinibu a potkanů skupiny kontrolní jsou shrnuty spolu s příslušnými směrodatnými odchylkami v tabulce 5.

*Tabulka 5 – Relativní kvantifikace genové exprese ledvinných CYP rodiny 2 vyjádřena pomocí hodnot  $\Delta\Delta C_t$  (3.9. VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ KVANTITATIVNÍ PCR) a příslušné směrodatné odchylky  $S_D$ . Kontrolní skupina (K), skupina potkanů vystavených vlivu vandetanibu (V) a lenvatinibu (L).*

SKUPINA	K		V		L	
GEN	$\Delta\Delta C_t$	$S_D$	$\Delta\Delta C_t$	$S_D$	$\Delta\Delta C_t$	$S_D$
CYP 2A2	15,61	1,40	-	-	15,68	4,99
CYP 2B1	14,48	0,91	12,96	0,99	13,38	0,33
CYP 2C11	3,15	0,24	3,99	0,51	2,97	0,10
CYP 2D1	2,89	0,21	3,19	0,51	3,64	0,46
CYP 2E1	4,1	0,14	3,79	0,04	3,64	0,21

Na obrázku 8 je vyjádřena relativní genová exprese zkoumaných genů v ledvinné tkáni potkanů vystavených vlivu vandetanibu nebo lenvatinibu v porovnání s mírou genové exprese zkoumaných genů u potkanů kontrolní skupiny.



*Obrázek 8 – Relativní genová exprese cytochromů P450 rodiny 2 v tkáni ledvin potkanů po podání vandetanibu a lenvatinibu. Standardní chyba měření byla vyhodnocena programem REST 2009. \* V případě vzorků z ledvinné tkáně potkanů vystavených vlivu vandetanibu nebylo možné vyhodnotit míru genové exprese kvůli nedetekovatelným výsledkům.*

V případě vzorků z tkáně ledvin potkanů vystavených vlivu vandetanibu nebylo možné reprodukovatelně vyhodnotit míru genové exprese genu CYP2A2. To mohlo být ovlivněno

jeho velice nízkým výskytem v tkáni ledvin. CYP2A2 lze nalézt především v jaterní tkáni potkaních samců<sup>29</sup>.

Stejně jako v případě jaterní tkáně nebyl ani v ledvinách pozorován výrazný vliv podávaných inhibitorů tyrosinkinas na genovou expresi vybraných izoform CYP2 *in vivo*. V ledvinách potkanů vystavených vlivu vandetanibu nicméně došlo k poklesu genové exprese *CYP2C11* přibližně na polovinu v porovnání s kontrolními vzorky a po podání lenvatinibu ke snížení genové exprese *CYP2D1*. Oproti tomu vyvolal lenvatinib mírný nárůst genové exprese *CYP2E1*. Ke zvýšení relativní genové exprese došlo v ledvinné tkáni potkanů vystavených vlivu lenvatinibu nebo vandetanibu také u genu *CYP2B1*, ale nelze dělat závěr, že mají tyto inhibitory tyrosinkinas výrazný vliv na genovou expresi *CYP2B1* vzhledem k velké standardní chybě měření.

U obou skupin vzorků z ledvina a jater byl v případě lenvatinibu pozorován nárůst u *CYP2E1*. V případě *CYP2E1* je hlavním způsobem indukce stabilizace kódující mRNA a stabilizace proteinu samotného<sup>23</sup>. Naměřené výsledky naznačují i větší zastoupení *CYP2E1* v kódující mRNA. Příčinu zvýšeného zastoupení *CYP2E1* ve vzorcích izolované RNA z jaterní a ledvinné tkáně potkanů vystavených vlivu vandetanibu a lenvatinibu oproti kontrolní skupině není možné v rámci provedeného měření určit.

Vedle studovaných zástupců cytochromů P450 rodiny 2 byl v rámci diplomové práce Mgr. Sandry Jelínkové zkoumán vliv inhibitorů tyrosinkinas na genovou expresi cytochromů P450 podrodin 1A a 3A a byl pozorován mírný, nicméně signifikantní, nárůst relativní genové exprese u genu *CYP1A1*, *3A1* u vzorků získaných z potkaních jater vystavených vlivu vandetanibu i lenvatinibu<sup>63</sup>, což mohlo naznačovat interakci studovaných inhibitorů tyrosinkinas s Ah receptorem, v případě *CYP1A1*, a PXR nebo CAR, v případě *CYP3A1*. Toto tvrzení nelze na základě provedených pozorování podávat jako holý fakt a jedná se pouze o spekulaci.

Lze tvrdit, že ani v jednom případě studovaných izoform CYP2 nedošlo, v obou zkoumaných orgánech, k výraznému vlivu na genovou expresi. Vandetanib ani lenvatinib nejsou induktory pro CYP rodiny 2 v tkáni potkaních jater a ledvin. Z těchto informací lze

předpokládat, že vandetanib ani lenvatinib nejsou ligandy pro receptory CAR, PXR a RXR, které se účastní indukce cytochromů P450 rodiny 2<sup>23</sup>.

## 5 ZÁVĚR

V rámci této bakalářské práce byl zkoumán vliv inhibitorů tyrosinkinas vandetanibu a lenvatinibu na genovou expresi biotransformačních enzymů cytochromů P450 rodiny 2 (CYP2A2, 2B1, 2C11, 2D1, 2E1).

Podařilo se splnit všechny stanovené cíle:

- Byla úspěšně izolována celková RNA z jaterní a ledvinné tkáně potkanů kmene Wistar
- Pomocí agarosové elektroforézy bylo potvrzeno, že byla úspěšně izolována nedegradovaná RNA
- Spektrofotometricky byla potvrzena čistota a dostatečná koncentrace izolovaných vzorků
- RNA v izolovaných vzorcích byla přepsána do komplementární cDNA, která dále sloužila jako templát pro kvantitativní PCR
- Pomocí kvantitativní PCR byla porovnána míra relativní genové exprese genů CYP2 ve vzorcích získaných z tkáně ledvin a jater potkanů, kteří byli vystaveni vlivu inhibitorů tyrosinkinas vandetanibu nebo lenvatinibu, a potkanů z kontrolní skupiny

Na základě zjištěných dat lze tvrdit, že inhibitory tyrosinkinas vandetanib a lenvatinib nemají výrazný vliv na míru genové exprese zkoumaných cytochromů P450 rodiny 2.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- (1) Henscheid, N.; Clarkson, E.; Myers, K. J.; Barrett, H. H. Physiological random processes in precision cancer therapy. *PLoS ONE*, **2018**, *13* (6), 1–25.
- (2) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, **2011**, *144* (5), 646–674.
- (3) Krupa, A.; Srinivasan, N. The repertoire of protein kinases encoded in the draft version of the human genome: Atypical variations and uncommon domain combinations. *Genome biology*, **2002**, *3* (12), 1–14.
- (4) Fabbro, D.; Ruetz, S.; Buchdunger, E.; Cowan-Jacob, S. W.; Fendrich, G.; Liebetanz, J.; Mestan, J.; O'Reilly, T.; Traxler, P.; Chaudhuri, B.; Heinz, F.; Zimmermann, J.; Meyer T.; Caravatti, G.; Furet, P.; Manley, P. W. Protein kinases as targets for anticancer agents: From inhibitors to useful drugs. *Pharmacology & therapeutics*, **2002**, *93* (2), 79–98.
- (5) Ferrari, S. M.; Bocci, G.; Di Desidero, T.; Elia, G.; Ruffilli, I.; Ragusa, F.; Orlandi, P.; Paparo, S. R.; Patrizio, A.; Piaggi, S.; La Motta, C.; Ulisse, S.; Baldini, E.; Materazzi, G.; Miccoli, P.; Antonelli, A.; Fallahi, P. Lenvatinib exhibits antineoplastic activity in anaplastic thyroid cancer *in vitro* and *in vivo*. *Oncology reports*, **2018**, *39* (5), 2225–2234.
- (6) Ferrari, S. M.; Bocci, G.; Di Desidero, T.; Ruffilli, I.; Elia, G.; Ragusa, F.; Fioravanti, A.; Orlandi, P.; Paparo, S. R.; Patrizio, A.; Piaggi, S.; La Motta, C.; Ulisse, S.; Baldini, E.; Materazzi, G.; Miccoli, P.; Antonelli, A.; Fallahi, P. Vandetanib has antineoplastic activity in anaplastic thyroid cancer, *in vitro* and *in vivo*. *Oncology reports*, **2018**, *39* (5), 2306–2314.
- (7) Matsuki, M.; Hoshi, T.; Yamamoto, Y.; Ikemori-Kawada, M.; Minoshima, Y.; Funahashi, Y.; Matsui, J. Lenvatinib inhibits angiogenesis and tumor fibroblast growth factor signaling pathways in human hepatocellular carcinoma models. *Cancer medicine*, **2018**, *7* (6), 2641–2653.
- (8) Černíková, A.; Jampílek, J. Strukturní modifikace léčiv ovlivňující biodostupnost a terapeutický účinek. *Chemické listy*, **2014**, *108* (1), 7–16.
- (9) Wang, X.; Zheng, H.; Shou, T.; Tang, C.; Miao, K.; Wang, P. Effectiveness of multi-drug regimen chemotherapy treatment in osteosarcoma patients: A network meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of orthopaedic surgery and research*, **2017**, *12* (1), 1–11.
- (10) Stiborová, M.; Hudeček, J.; Hodek, P.; Frei, E. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chemické listy*, **1999**, *93* (4), 229–237.
- (11) Klingenberg, M. Pigments of rat liver microsomes. *Archives of biochemistry and biophysics*, **2003**, *409*, 2–6.
- (12) Cytochrome P450 Homepage (přístup 5.7.2018)  
<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>.



- (13) Hlavica, P. Challenges in assignment of allosteric effects in cytochrome P450-catalyzed substrate oxidations to structural dynamics in the hemoprotein architecture. *Journal of inorganic biochemistry*, **2017**, 167, 100–115.
- (14) Guo, L.-H.; Li, Z.-M.; Guo, L.-H.; Ren, X.-M. Biotransformation of 8:2 fluorotelomer alcohol by recombinant human cytochrome P450s, human liver microsomes and human liver cytosol. *Environmental Science-Process & impacts*, **2016**, 18 (5), 538–546.
- (15) Thies, F.; Backhaus, T.; Bossman, B.; Grimme, L. H. Xenobiotic biotransformation in unicellular green algae: Involvement of cytochrome P450 in the activation and selectivity of the pyridazinone pro-herbicide metflurazon. *Plant Physiology*, **1996**, 112 (1), 361–370.
- (16) Teeyapant, P.; Sikaphan, S.; Parnmen, S. Bioaccumulation of DDT residues in human serum: An historical use of DDT indoor residual spraying in malaria endemic regions of Thailand. *Environment Asia*, **2014**, 7 (2), 1–6.
- (17) Afzal, A.; Fatima, S.; Ahmed, A. M. Methanol Poisoning; challenging diagnosis and management without fomepizole and ethanol. *The professional medical journal*, **2017**, 24 (3), 490–494.
- (18) Stiborová, M.; Martínek, V.; Rýdlová, H.; Hodek, P.; Frei, E. Sudan I is a potential carcinogen for humans: Evidence for its metabolic activation and detoxication by human recombinant cytochrome P450 1A1 and liver microsomes. *Cancer research*, **2002**, 62 (20), 5678–5684.
- (19) Danielson, P. The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug Metabolism in Humans. *Current drug metabolism*, **2003**, 3 (6), 561–597.
- (20) Přenášky z Xenobiochemie Prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. v rámci předmětu Biochemie II. Přírodovědecká fakulta Univerzita Karlova, katedra biochemie, **2018**.
- (21) Nelson, D. R. Metazoan cytochrome P450 evolution. *Comparative biochemistry physiology*, **1998**, 121, 15–22.
- (22) Colomé, J. S. Gene Regulation in Bacteria. *Salem press encyclopedia of health*, **2014**.
- (23) Dickins, M. Induction of Cytochromes P450. *Current topics in medicinal chemistry*, **2004**, 4 (16), 1745–1766.
- (24) Hewitt, N. J.; Lecluyse, E. L.; Ferguson, S. S. Induction of hepatic cytochrome P450 enzymes: methods, mechanisms, recommendations, and *in vitro-in vivo* correlations. *Xenobiotica*, **2007**, 37 (10–11), 1196–1224.
- (25) Roberts, B. J.; Song, B. J.; Soh, Y.; Park, S. S.; Shoaf, S. E. Ethanol induces CYP2E1 by protein stabilization: Role of ubiquitin conjugation in the rapid degradation of CYP2E1. *Journal of biological chemistry*, **1995**, 270 (50), 29632–29635.

- (26) Gerbal-Chaloin, S.; Daujat, M.; Pascussi, J.-M.; Pichard-Garcia, L.; Vilarem, M.-J.; Maurel, P. Transcriptional regulation of CYP2C9 gene role of glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor. *Journal of biological chemistry*, **2002**, 277 (1), 209–217.
- (27) Pascussi, J.-M.; Drocourt, L.; Gerbal-Chaloin, S.; Fabre, J.-M.; Maurel, P.; Vilarem, M.-J. Dual Effect of Dexamethasone on CYP3A4 Gene Expression in Human Hepatocytes: Sequential role of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor. *European journal of biochemistry*, **2001**, 268 (24), 6346–6358.
- (28) Mackowiak, B.; Wang, H. Mechanisms of xenobiotic receptor activation: Direct vs. indirect. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2016**, 1859 (9), 1130–1140.
- (29) Martignoni, M.; Groothuis, G. M. M.; de Kanter, R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, **2006**, 2 (6), 875–894.
- (30) Sueyoshi, T.; Kawamoto, T.; Zelko, I.; Honkakoski, P.; Negishi, M. The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene. *The journal of biological chemistry*. **1999**, 274 (10), 6043–6046.
- (31) Yamazaki, H.; Inui, Y.; Yun, CH.; Guengerich, FP.; Shimada, T. Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of N-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. *Carcinogenesis* **1992**, 13 (10), 1789–1794.
- (32) Haduch, A.; Wójcikowski, J.; Daniel, A. W. Effect of short- and long-term treatment with antidepressant drugs on the activity of rat CYP2A in the liver. *Pharmacological reports*, **2005**, 57 (6), 774–781.
- (33) Su, T.; Ding, X. Regulation of the cytochrome P450 2A genes. *Toxicology and applied pharmacology*, **2004**, 199 (3), 285–294.
- (34) Lee, A. M.; Miskys, S.; Tyndale, R. F. Phenobarbital increases monkey *in vivo* nicotine disposition and induces liver and brain CYP2B6 protein. *British journal of pharmacology*, **2006**, 148 (6), 786–794.
- (35) Annaert, P. Expression and induction potential of cytochromes P450 in human cryopreserved hepatocytes. *Drug metabolism and disposition*, **2005**, 33 (7), 1004–1016.
- (36) Morgan, E. T.; MacGeoch, C.; Gustafsson, J. A. Hormonal and developmental regulation of expression of the hepatic microsomal steroid 16 alpha-hydroxylase cytochrome P-450 apoprotein in the rat. *Journal of biological chemistry*, **1985**, 260 (22), 11895–11898.
- (37) Hiroi, T.; Chow, T.; Imaoka, S.; Funae, Y. Catalytic specificity of CYP2D isoforms in rat and human. *Drug metabolism and disposition*. **2002**, 30 (9), 970–976.

- (38) Zuber, R.; Anzenbachero, E.; Anzenbacherová, P. Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *Journal of cellular and molecular medicine*, **2002**, 6 (2), 189–198.
- (39) Venhorst, J.; ter Laak, A. M.; Commandeur, J. N. M.; Funae, Y.; Hiroi, T.; Vermeulen, N. P. E. Homology Modeling of Rat and Human Cytochrome P450 2D (CYP2D) Isoforms and Computational Rationalization of Experimental Ligand-Binding Specificities. *Journal of medical chemistry*, **2003**, 46 (1), 74–86.
- (40) Chow, T.; Hiroi, T.; Imaoka, S.; Chiba, K.; Funae, Y. Isoform-Selective Metabolism of Mianserin by Cytochrome P-450 2D. *Drug metabolism and disposition*, **1999**, 27 (10), 1200–1204.
- (41) Zeng, L.; Chen, Y.; Wang, Y.; Wang, Y.; Yu, L.-R.; Knox, B.; Chen, J.; Shi, T.; Chen, S.; Ren, Z.; Guo, L.; Wu, Y.; Liu, D.; Huang, K.; Tong, W.; Yu, D.; Ning, B. MicroRNA Hsa-MiR-370-3p suppresses the expression and induction of CYP2D6 by facilitating mRNA degradation. *Biochemical pharmacology*, **2017**, 140, 139–149.
- (43) Lieber, C. S. Cytochrome P-450E1: Its physiological and pathological role. *Physiological review*, **1997**, 77 (2), 517–544.
- (44) Kalaivani, R.; Reema, R.; Srinivasan, N. Recognition of sites of functional specialisation in all known eukaryotic protein kinase families. *Plos computational biology*, **2018**, 14 (2), 1–32.
- (45) Robinson, D. R.; Wu, Y. M.; Lin, S. F. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, **2000**, 19 (49), 5548–5557.
- (46) Jacobsen, F. A.; Scherer, A. N.; Mouritsen, J.; Bragadottir, H.; Backstrom, B. T.; Sardar, S.; Holmberg, D.; Koleske, A. J.; Andersson, A. A role for the non-receptor tyrosine kinase Abl2/Arg in experimental neuroinflammation. *Journal of neuroimmune pharmacology*, **2018**, 13 (2), 265–276.
- (47) Frost, D. O. Chapter 3 BDNF/TrkB signaling in the developmental sculpting of visual connections. *Progress in Brain Research*, **2001**, 134, 35–49.
- (48) Zaidi, S. K.; Qureshi, S.; Qamar, F. N. X-linked agammaglobulinemia - First case with bruton tyrosine kinase mutation from pakistan. *Journal of pakistan medical association*, **2017**, 67 (3), 471–473.
- (49) Sun, Y.; Yin, X.; Wen, M.-M.; Zhang, J.; Wang, X.-J.; Xia, J.-H.; Zhang, Y.-N.; Zhang, Z.-P.; Li, X.-F.; Feili, X. EGFR mutations subset in chinese lung squamous cell carcinoma patients. *Molecular medicine reports*, **2018**, 17 (6), 7575–7584.
- (50) Kamel-Reid, S.; Chong, G.; Ionescu, D. N.; Magliocco, A. M.; Spatz, A.; Tsao, M.; Weng, X.; Young, S.; Zhang, T.; Soulieres, D. EGFR tyrosine kinase mutation testing in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Current oncology*, **2012**, 19 (2), 67–74.

- (51) Cockrell, L. M., B. S. Tyrosine kinase inhibitors (Cancer Treatment). *Salem press encyclopedia of health*, **2014**.
- (52) Inoue, K.; Mizuo, H.; Kawaguchi, S.; Fukuda, K.; Kusano, K.; Yoshimura, T. Oxidative metabolic pathway of lenvatinib mediated by aldehyde oxidase. *Drug metabolism & disposition*. **2014**, 42 (8), 1326–1333.
- (53) Dubbelman, A.-C.; Nijenhuis, C. m.; Jansen, R. s.; Rosing, H.; Mizuo, H.; Kawaguchi, S.; Critchley, D.; Shumaker, R.; Schellens, J. h. m.; Beijnen, J. h. Metabolite profiling of the multiple tyrosine kinase inhibitor lenvatinib: A cross-species comparison. *Invest new drugs* **2016**, 34 (3), 300–318.
- (54) Tamai, T.; Hayato, S.; Hojo, S.; Suzuki, T.; Okusaka, T.; Ikeda, K.; Kumada, H. Dose finding of lenvatinib in subjects with advanced hepatocellular carcinoma based on population pharmacokinetic and exposure–response analyses. *The journal of clinical pharmacology*, **2017**, 57 (9), 1138–1147.
- (55) Liu, Y.; Qi, M.; Hou, S.; Shao, L.; Zhang, J.; Li, Y.; Liu, Q. Risk of rash associated with vandetanib treatment in non-small-cell lung cancer patients: A meta-analysis of 9 randomized controlled trials. *Medicine (Baltimore)* **2017**, 96 (43), 1–7.
- (56) Vandetanib vzorec (přístup 10.7.2018)  
<https://www.reagentsdirect.com/index.php/vandetanib.html>
- (57) Martin, P.; Oliver, S.; Kennedy, S.-J.; Partridge, E.; Hutchison, M.; Clarke, D.; Giles, P. Pharmacokinetics of vandetanib: Three phase I studies in healthy subjects. *Clinical therapeutics*, **2012**, 34 (1), 221–237.
- (58) Martin, P.; Oliver, S.; Robertson, J.; Kennedy, S.-J.; Read, J.; Duvauchelle, T. Pharmacokinetic drug interactions with vandetanib during coadministration with rifampicin or itraconazole. *Drugs R. D.* **2011**, 11 (1), 37–51.
- (59) "GENEzol™ Reagent Geneaid" návod výrobce. (Přístup 20.7.2018)  
<http://www.geneaid.com/products/tri-rna-extraction/gene-zol-reagent-rna-extraction>
- (60) "RNA Loading Dye (2X)" návod výrobce. (Přístup 21.7.2018)  
<https://international.neb.com/protocols/2012/10/12/sample-preparation-using-provided-rna-loading-dye-2x-n0362>
- (61) "High - Capacity CDNA Reverse Transcription Applied Biosystems" návod výrobce. (Přístup 24.7.2018)  
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4368814>
- (62) "DNase I, RNase-free Thermo Fisher Scientific" návod výrobce. (Přístup 20.7.2018)  
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EN0521>
- (63) "FastStart Essential DNA Probes Master Roche" návod výrobce. (Přístup 21.7.2018)  
[https://www.lifescience.roche.com/en\\_cz/products/faststart-essential-dna-probes-master.html](https://www.lifescience.roche.com/en_cz/products/faststart-essential-dna-probes-master.html)

(65) Jelínková, S. Vliv vandetanibu, lenvatinibu a ellipticinu na expresi potkaních cytochromů P450 1A a 3A. Diplomová práce, katedra biochemie Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, **2018**.

„Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.“

[illegible]